

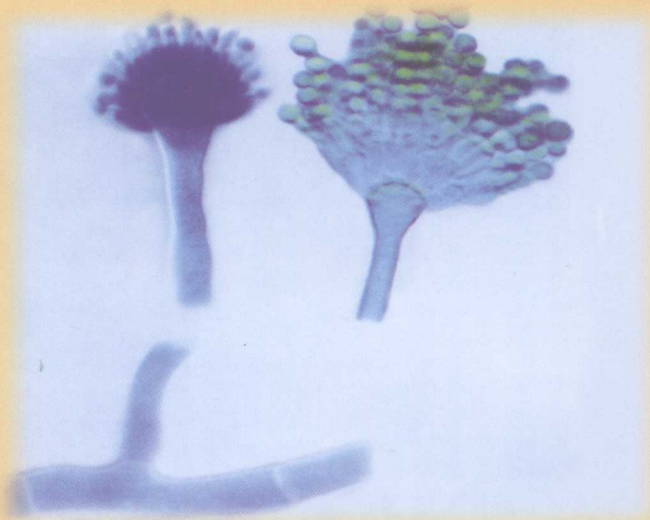
中国科学院教材建设专家委员会规划教材

全国高等医药院校教材 · 供临床、基础、药学、预防、口腔、
护理、检验、影像、麻醉等专业使用

医学微生物实验学

第3版

张卓然 黄敏 主编



科学出版社
www.sciencep.com

中国科学院教材建设专家委员会规划教材

全国高等医药院校教材

供临床、基础、药学、预防、口腔、护理、检验、影像、麻醉等专业使用

医学微生物实验学

第3版

主 编 张卓然 黄 敏
副主编 马淑霞 刘 新 李 会 李明成

范晓磊 郑丛龙 姜 欣

编 者 (以姓氏笔画为序)

马淑霞 佳木斯大学

方 芳 沈阳医学院

田延东 大连大学医学院

刘 新 沈阳医学院

李 会 辽宁医学院

李丽秋 佳木斯大学

李明成 北华大学医学检验学院

吴学敏 辽宁医学院

陈 曦 北华大学医学检验学院

陈文娜 辽宁中医药大学

张卓然 大连医科大学

范晓磊 大连医科大学

郑丛龙 大连大学医学院

姜 欣 辽宁中医药大学

唐 立 大连医科大学

黄 敏 大连医科大学

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书系全国高等医药院校规划教材,可供高校基础和临床各专业开设微生物学实验课使用,也可作为微生物学临床检验人员的工具书和上岗培训用书。全书包括微生物实验基本技术,细菌学、真菌学及病毒学实验,各种临床标本检查,微生物非培养法鉴定技术和质量控制等7部分内容,分为50项共154个实验。内容涉及微生物学的实验原理和基本技术,各种微生物的系统检验,各种临床标本的检测方法,技术方法翔实,图文并茂。其中非培养法鉴定技术是针对难培养或不能培养微生物的感染难以进行病原学检测的瓶颈而设计的。并针对目前仍以微生物的分离培养作为病原学诊断的“金标准”,提出要以非培养法鉴定技术替代微生物的分离培养,建立新的病原学诊断“金标准”。要完成本教材全部实验内容约需120学时,各校可根据各自特点和专业要求选择适当的教学内容。

本书可供医药院校学生使用。另外,本书的技术和方法也可作为临床微生物检验的操作指南,也是广大微生物学工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物实验学 / 张卓然,黄敏主编. —3版. —北京:科学出版社,2008
中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等医药院校教材
ISBN 978-7-03-021111-8

I. 医… II. ①张…②黄… III. 医药学:微生物学—实验—医学院校—教材 IV. R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第023463号

策划编辑:沈红芬 夏宇 / 责任编辑:胡治国 / 责任校对:张琪
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1998年4月第二版 开本:787×1092 1/16

2008年3月第三版 印张:16 1/2 插页:4

2008年3月第九次印刷 字数:383 000

印数:21 501—25 500

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换<鸿昌>)

前 言

医学微生物实验学是与医学微生物学课程相配套的实验教材,其前身曾在西南和东北地区多所医学院校使用过,历经3次改版,凝聚了许多师生的汗水和努力,尤其是我室魏曦院士、陈立予教授等老一辈著名科学家给本书打下牢固基础。从第2版就吸收了几所兄弟院校的老师合作,经过十余年的教学实践,得到广大师生的肯定和欢迎,其技术曾被其他论著多次引用。第三次改版邀请了更多的院校参编,使本书的水平得到更大的提高,内容不断充实与完善。

本书仍保持上一版的风格,保留原微生物实验基本技术,细菌学、真菌学及病毒学实验,各种临床标本检查,质量控制等6个部分的内容,将原微生物学诊断新技术改为微生物非培养法鉴定技术,这是针对难培养或不能培养微生物的感染难以进行病原学检测的瓶颈而设计的。并针对目前感染性疾病的病原学诊断仍以微生物的分离培养作为“金标准”的观点,提出要以非培养法鉴定技术替代微生物的分离培养,建立新的病原学诊断“金标准”。

新版共50项实验,要完成这些实验内容约需120学时。各校可按医学微生物学教学大纲要求,根据各专业教学的实际教学时数,教学习惯和设备条件等,选择恰当的教学内容。我们所选实验是坚持可操作性的原则,举一反三的收效,联系临床实际的指导思想。随着科学技术的进步,临床上出现了不少微生物商品化、自动化检测方法,但我们仍然坚持基本理论、基本知识和基本技能的原则,加强实验的基本原理、基本方法和基本技术的学习;主张循序渐进,提倡做系统性连续实验,通过模拟临床标本的微生物学检查,设置实验设计平台,培养学生的兴趣和进行科学研究的积极性,提高学生的实验水平和解决实际问题的本领。为解决散学示教片不足困难,本书增加了常见微生物的彩图备师生参考,图文并茂也是本书的一大特点。另外,本书的技术和方法也可作为临床微生物检验的操作指南,也是广大微生物学工作者的参考用书。

本书再版得到多所兄弟院校领导的支持与合作,得到大连医科大学领导的支持与帮助,同时也得到科学出版社的鼎力支持,在此一并表示衷心的感谢。由于我们的学术水平和编写能力有限,又是多所院校的首次合作,内容和安排上难免会有疏漏和错误,恳请同道斧正。

大连医科大学
张卓然 黄敏
2006年7月13日

微生物学实验室规则

医学微生物实验室应严格执行中华人民共和国卫生部发布的《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》的要求,根据微生物以及各种生物活性因子对个体和群体的危害性,医学院校教学用实验室应为一级生物安全防护(BSL-1)实验室,所用实验材料应为危害性最低的病毒、细菌、真菌和寄生虫等生物因子,实验室的结构、安全操作规程和安全设备应适用于对健康成年人已知无致病作用的微生物。根据一级生物安全防护实验室常规微生物操作规程中的安全要点,并结合教学环节的特点,要求师生进入实验室必须严格遵守以下规则:

1. 禁止非工作人员进入实验室。遇到参观实验室等特殊情况,须经实验室负责人批准后方可进入。
2. 书包、衣物等挂放于室外,切勿带入室内。必须带人的书籍和文具等也应放置在非操作区,以免污染。
3. 进入实验室应穿好隔离衣、戴好帽子。无菌操作时必须戴好口罩。
4. 禁止在实验室内饮食、吸烟、处理隐形眼镜、化妆及存储食物。
5. 认真进行各项实验,严格掌握无菌技术,用移液器吸取液体,禁止口吸。各种实验物品按指定地点存放,如吸过菌液的吸管、毛细滴管投放入装有消毒液的消毒缸内;用过的玻片、L形棒等放入装有消毒液的搪瓷缸内,绝对不要乱放在桌面上或冲洗于水槽中。
6. 按照实验室生物安全规程操作,降低溅出和气溶胶的产生。当实验室中发生差错或意外事故时,应立即报告教师及时处理。切勿隐瞒或自作主张违规处理。如万一发生有菌材料污染桌面、衣物等,应立即用抹布浸沾2%~3%来苏(或5%苯酚溶液),泡在污染部位,经半小时后方可抹去。如手上沾有活菌也要用消毒液泡10分钟左右,再以肥皂及自来水反复洗净。
7. 实验室要制定尖锐器具的安全操作规程,避免锐器伤及皮肤、黏膜等。并制定有效的防鼠防虫措施。
8. 要爱护室内仪器设备,按使用规则操作,不得随意拨动电器开关;显微镜用后要擦净,各功能部件复位,登记使用情况后放入显微镜柜内。要节约使用实验材料,如不慎损坏了器材等,应报告老师进行登记。
9. 实验完毕应整理桌面,每天至少消毒一次工作台面,活性物质溅出后要随时消毒。关好水、电及煤气开关。需培养的材料要标记标本名称及班、组、姓名等,送入孵箱培养。观察结果后的培养物和废弃物在运出实验室之前必须进行灭活,如高压灭活。需运出实验室灭活的物品必须放在专用密闭容器内,送消毒室处理。
10. 实验完毕,脱下隔离衣、帽子,按要求将隔离衣反折、叠好,按座号放入柜内。然后用消毒液及自来水洗手后再离开实验室。建立值日生制度,负责检查实验室的卫生、水电、煤气及门窗的安全。

目 录

微生物学实验室规则

第一部分 微生物实验的基本技术

第一实验 细菌的人工培养法	1	实验 17 沉淀试验(毛细管法)	21
实验 1 基础培养基的制备	1	实验 18 荚膜肿胀试验	21
实验 2 细菌的分离与接种法	2	第五实验 消毒与灭菌	22
实验 3 倾注培养和活菌计数	6	实验 19 常用消毒、灭菌法及除菌滤器 的使用	22
第二实验 细菌形态学检查法	7	实验 20 常用化学消毒剂对细菌的 影响	26
实验 4 显微镜的使用	7	实验 21 噬菌体的特异溶菌试验	28
实验 5 细菌不染色标本检查法(悬滴 法)	7	第六实验 细菌抗生素敏感性测定	28
实验 6 细菌涂片的制备及革兰染色法	8	实验 22 纸片扩散法	29
实验 7 细菌的基本形态和特殊结构 观察	9	实验 23 稀释法	30
实验 8 测微器的使用	10	实验 24 E 试验	32
第三实验 细菌生化鉴定法	11	第七实验 细菌的遗传与变异	35
实验 9 单糖发酵试验	11	实验 25 细菌变异现象的观察	35
实验 10 氧化酶试验	12	实验 26 R 质粒的传递试验	36
实验 11 过氧化氢酶试验	12	实验 27 质粒 DNA 转化试验	37
实验 12 IMViC 试验	13	实验 28 细菌 DNA 提取	38
实验 13 硫化氢试验	14	第八实验 实验动物感染及细菌毒素检 测	39
实验 14 脲酶试验	15	实验 29 实验动物的管理与选择	39
实验 15 数字编码测定法	15	实验 30 动物接种与采血技术	40
第四实验 细菌血清学鉴定法	17	实验 31 细菌毒素检测	42
实验 16 凝集试验	17		

第二部分 细菌学实验

第九实验 球菌	44	鉴别	49
实验 32 葡萄球菌属	44	实验 35 抗链球菌溶血素“O”试验	50
实验 33 链球菌属	46	实验 36 奈瑟菌属	51
实验 34 肺炎链球菌与甲型链球菌的		第十实验 肠杆菌科 I	53

实验 37 埃希菌属	53	第十八实验 其他细菌	84
实验 38 沙门菌属	55	实验 60 嗜血杆菌属	84
实验 39 志贺菌属	56	实验 61 布鲁菌属	85
实验 40 肥达(Widal)试验	56	实验 62 军团菌属	87
第十一实验 肠杆菌科 II	58	实验 63 鲍特菌属、巴斯德菌属、弗朗西丝菌属	88
实验 41 克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属	58	第十九实验 API 鉴定系统在细菌学检验中的应用	89
实验 42 变形杆菌属与摩根菌属 ...	59	实验 64 API 20E 系统用于肠杆菌科的鉴定	89
实验 43 小肠结肠炎耶尔森菌	60	实验 65 API 20NE 系统用于非发酵菌的鉴定	93
第十二实验 弧菌属、气单胞菌属、邻单胞菌属	60	实验 66 API Rapid ID32A 用于厌氧菌的鉴定	95
实验 44 霍乱弧菌	61	第二十实验 螺旋体	98
实验 45 副溶血弧菌	62	实验 67 螺旋体的形态观察	98
实验 46 气单胞菌属和邻单胞菌属	64	实验 68 钩端螺旋体	99
第十三实验 弯曲菌属和幽门螺杆菌	65	实验 69 梅毒螺旋体	101
实验 47 弯曲菌属	65	实验 70 伯氏螺旋体	104
实验 48 幽门螺杆菌	67	第二十一实验 支原体	105
第十四实验 厌氧菌	68	实验 71 肺炎支原体形态及菌落观察	105
实验 49 厌氧芽孢梭菌	69	实验 72 肺炎支原体冷凝集试验 ...	105
实验 50 无芽孢厌氧菌	71	实验 73 ELISA 方法检测肺炎支原体 IgG/IgA/IgM 抗体 ...	106
第十五实验 革兰阳性杆菌	72	实验 74 溶脲脲原体脲酶试验	108
实验 51 棒状杆菌属	73	第二十二实验 衣原体	108
实验 52 炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌	74	实验 75 衣原体包涵体的形态观察	109
实验 53 李斯特菌属	76	实验 76 直接免疫荧光法检测沙眼衣原体	109
第十六实验 分枝杆菌属及需氧性放线菌	77	实验 77 ELISA 法检测衣原体	111
实验 54 结核分枝杆菌	77	实验 78 细胞培养分离衣原体	112
实验 55 麻风分枝杆菌	79	第二十三实验 立克次体	113
实验 56 诺卡菌属	80	实验 79 立克次体的形态与染色 ...	114
第十七实验 非发酵革兰阴性杆菌	80	实验 80 外斐反应	114
实验 57 假单胞菌属	81		
实验 58 黄杆菌属	83		
实验 59 不动杆菌属	83		

第三部分 真菌学实验

- 第二十四实验 真菌的基本性状** 117
- 实验 81 真菌染色及形态结构的观察
 117
- 实验 82 真菌的培养 119
- 实验 83 真菌的生化及鉴定试验 ... 120
- 实验 84 真菌的药敏试验 122
- 第二十五实验 常见浅部真菌的鉴定**
 122
- 实验 85 毛癣菌属 123
- 实验 86 小孢子菌属 123
- 实验 87 表皮癣菌属 124
- 第二十六实验 常见深部真菌的鉴定**
 124
- 实验 88 假丝酵母菌属 125
- 实验 89 隐球菌属 126
- 实验 90 曲霉菌属 126
- 实验 91 组织胞浆菌属 127
- 实验 92 卡氏肺孢菌 127
- 实验 93 API 20C AUX 系统用于酵
 母样真菌的鉴定 127

第四部分 病毒学实验

- 第二十七实验 病毒的分离培养技术**
 130
- 实验 94 病毒的动物接种法 130
- 实验 95 鸡胚培养法 131
- 实验 96 病毒组织培养法 133
- 实验 97 水泡性口炎病毒在细胞上的
 感染性测定 135
- 第二十八实验 呼吸道病毒** 136
- 实验 98 流感病毒的分离与鉴定 ... 136
- 实验 99 ELISA 间接法检测副流感病
 毒(PFV)血清 IgM 抗体 ... 139
- 实验 100 禽 H5 病毒核酸检测 140
- 第二十九实验 肠道病毒** 141
- 实验 101 肠道病毒的分离鉴定 ... 141
- 实验 102 轮状病毒的检测 142
- 第三十实验 甲型和戊型肝炎病毒** ... 145
- 实验 103 ELISA 法检测甲型肝炎病
 毒 IgM 抗体 145
- 实验 104 ELISA 法检测 HEV-IgG
 抗体 146
- 第三十一实验 乙型、丙型和庚型肝炎
 病毒** 147
- 实验 105 乙型肝炎病毒 HBsAg、HBe-Ag、
 抗 HBe 和抗 HBc 检测 147
- 实验 106 PCR 法检测 HBV-DNA
 152
- 实验 107 斑点杂交法检测 HBV-
 DNA 153
- 实验 108 ELISA 法检测 HCV-IgM
 抗体 154
- 实验 109 PCR 法检测 HCV-RNA
 155
- 实验 110 ELISA 法检测 HGV-IgG
 抗体 157
- 第三十二实验 虫媒病毒** 157
- 实验 111 乙型脑炎病毒 IgM 抗体
 检测 158
- 实验 112 登革病毒 158
- 第三十三实验 出血热病毒** 161
- 实验 113 免疫荧光法检测抗汉坦病
 毒 IgM 161
- 实验 114 ELISA 法检测汉坦病毒特
 异性 IgM 162
- 第三十四实验 疱疹病毒** 163
- 实验 115 抗单纯疱疹病毒抗体检查
 163
- 实验 116 PCR 法检测 HSV-DNA
 164

实验 117 生物素-链霉亲和素系统 ELISA 检测抗巨细胞病毒 抗体	165	实验 120 WB 法检测 HIV 抗体确认 试验	168
实验 118 免疫荧光法检测 EBV IgA 抗体	166	第三十六实验 肿瘤病毒	170
第三十五实验 人类免疫缺陷病毒 ...	167	实验 121 WB 法检测 HTLV 抗体 试验	170
实验 119 ELISA 法检测 HIV 抗体 筛选试验	167	实验 122 PCR 法检测 HPV-DNA	172

第五部分 各种临床标本的微生物学检查

第三十七实验 血液标本病原学鉴定	174	鉴定	185
第三十八实验 粪便标本病原学鉴定	177	第四十一实验 脓汁标本的病原学鉴定	189
第三十九实验 尿液及生殖道标本 ...	180	第四十二实验 无菌体液标本	191
实验 123 尿液标本病原学鉴定 ...	180	实验 125 脑脊液标本的病原学鉴定	191
实验 124 生殖道标本病原学鉴定	183	实验 126 穿刺液标本的病原学鉴定	194
第四十实验 痰液及呼吸道标本病原学			

第六部分 微生物非培养法鉴定技术

第四十三实验 临床标本的直接显微镜 检查	197	实验 136 固相膜分子杂交	210
实验 127 微生物形态学检查	197	实验 137 原位杂交	211
实验 128 荧光抗体染色试验	198	实验 138 PCR 技术	212
实验 129 病毒的电子显微镜观察	199	第四十六实验 微生物核蛋白体分类 鉴定	214
第四十四实验 微生物特异性蛋白质及 抗原的检测	200	实验 139 16S rRNA 的寡核苷酸序 列分析	214
实验 130 胶体金法检测衣原体 ...	200	实验 140 UPPCR-CE-RFLP 法检测 溶脲脲原体两个生物群 ...	215
实验 131 直接荧光抗体染色法 ...	202	第四十七实验 气相与液相色谱技术	217
实验 132 ELISA 夹心法检测呼吸道 合胞病毒抗原	202	实验 141 气相色谱	217
第四十五实验 核酸检测技术	203	实验 142 高效液相色谱	218
实验 133 细菌的培养和破壁	203	第四十八实验 发光分析技术	219
实验 134 DNA 的提取	203	实验 143 化学发光技术	220
实验 135 细菌 DNA 中 G+C mol% 的测定	207	实验 144 生物发光技术	221

第七部分 质量控制和实验设计

第四十九实验 医院内感染监测与质量 控制	222	监测	226
实验 145 空气消毒效果的监测 ...	222	实验 150 紫外线灯的消毒效果监测	227
实验 146 物体表面细菌污染监测	223	实验 151 无菌试验	227
实验 147 医护人员手细菌污染 监测	224	第五十实验 实验设计	229
实验 148 使用中的消毒液与无菌器 械保存液污染监测	224	实验 152 临床检测方案的设计 ...	229
实验 149 压力蒸汽灭菌器灭菌效果	224	实验 153 新方法、新技术的设计	230
		实验 154 暴发流行的实验室工作	232
附录			233
I. 实验室常用器材的处理与消毒灭菌			233
II. 常用培养基			234
III. 常用染色液			240
IV. 常用试剂和溶液			243
V. 药敏试验用液及材料制备			245
VI. 细胞培养常用试剂及培养液			246
VII. 菌种保存与保管			248
参考文献			252
图版			

第一部分 微生物实验的基本技术

医学微生物实验学是根据病原微生物的生物学性状、感染性与免疫性等设计出各种试验,以研究与确定感染性疾病的病原学特征及诊断方法。本部分概括了微生物学实验的基本原理与方法。包括对病原微生物的分离培养,生长特性的观察,形态学、生化学、血清学三大鉴定技术,以及对该微生物的药敏试验等。必要时尚需进行动物感染性试验,以协助临床的诊断与治疗。另外,还要对外界环境的影响、微生物本身的遗传性与变异性等,进行深入研究,以利于人类最终能控制和消灭传染性疾病。

第一实验 细菌的人工培养法

感染性疾病的诊断关键在于病原菌的分离与鉴定,人工培养法为细菌提供必要的环境条件,使其在体外生长繁殖。本实验的目的是为了了解基础培养基的主要成分和制备工艺,掌握在各种培养基上接种细菌的方法;观察和描述细菌在各种培养基上的生长情况。

实验 1 基础培养基的制备

培养基为培养细菌的人工饲料,是由适合细菌生长繁殖的各种营养成分配制而成。基础培养基中所含的营养物质基本能满足一般病原菌生长繁殖时所需的氮源、碳源和无机盐等。在基础培养基的基础上增添某些特殊成分(如糖类、血液、抑制剂等)则可制成有特殊用途的营养培养基、鉴别培养基和选择培养基等。

一、液体培养基

【材料】

1. 营养物 牛肉膏、蛋白胨、NaCl、 $K_2 HPO_4$ 、蒸馏水。
2. 比色管、水、NaOH 溶液(1mol/L 及 0.1mol/L)、0.02%酚红溶液、吸管、橡皮乳头、滤纸、量筒、天平、中试管等。

【方法】

1. 将牛肉膏 0.3g、蛋白胨 1g、NaCl 0.5g、 $K_2 HPO_4$ 0.2g,加入装有 100ml 蒸馏水的 250ml 的三角烧瓶内,在沸水浴中加热使之完全溶解。

2. 冷至 40~45℃时,以 0.1mol/L NaOH 溶液矫正酸碱度至 pH7.6。方法如下:

(1) 取 3 支和标准比色管规格相同的空白比色管,其中一管加蒸馏水 5ml,其余 2 管加待测 pH 的培养基各 5ml,其中的一管加入 0.02%酚红指示剂 0.25ml。

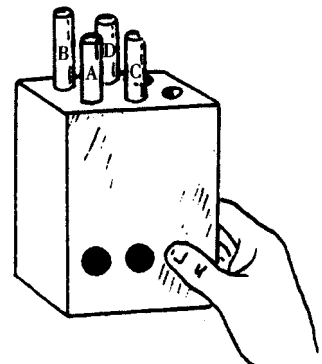


图 1-1-1 比色架

A. 培养基管;B. 标准比色管;C. 加有指示剂的培养基管;D. 蒸馏水管

(2) 按图 1-1-1 所示次序,将各管插入比色架孔内,然后对光比较,若管 3 的色调不同于标准比色管,则徐徐加入 0.1mol/L NaOH 溶液(或 HCl 溶液)摇匀,直至色调与标准比色管相同为止,读记用去的 NaOH(或 HCl)溶液量。

(3) 计算 0.1mol/L NaOH 溶液的需要量,并换算成 1mol/L NaOH 溶液量。假设 5ml 的待测培养基需加 0.1mol/L NaOH 溶液 0.25ml 始成 pH7.6,则 100ml 培养基需用 0.1mol/L NaOH 溶液 5ml,等于 1mol/L NaOH 溶液 0.5ml。

计算式 $5 : 0.25 = 100 : x$

$$x = \frac{0.25 \times 100}{5} = 5 \text{ml}(0.1 \text{mol/L NaOH}) = 0.5 \text{ml}(1 \text{mol/L NaOH})$$

3. pH 调整后,再煮沸 10 分钟,使培养基中部分蛋白质及磷酸盐等因加碱与再度加热的影响而重新凝固沉淀,滤纸过滤澄清,补足失水。重新测校 pH 一次,若变更很大应重新校正。

4. 根据需要分装于试管或三角烧瓶中。

5. 将已分装好的试管,分捆扎好,并将扎好的每捆试管和三角烧瓶,分别用纸包好棉塞口,置高压灭菌器内 103.4kPa 蒸汽压力下(121.3℃)灭菌 15~20 分钟。(不耐高压的培养基则可采用流通蒸汽灭菌或间歇灭菌,对含有糖类的培养基可采用 68 kPa 蒸汽压力 15 分钟灭菌)。

6. 无菌试验 将已灭菌的培养基,置无菌试管内,放在 37℃ 孵箱中培养 24h,如无细菌生长,即可应用。

二、琼脂固体培养基

琼脂是从海藻石花菜中提出的一种半乳糖胶,对细菌无营养作用,加入的目的是使培养基固态化,其熔点为 98℃,低于 45℃ 以下,则凝固成凝胶状态。琼脂通常呈酸性,加入液体培养基后可使 pH 下降 0.2 左右,故在制作固体培养基时,一般采用 pH 较高的液体培养基,当加入琼脂后,可以避免重新测校。

【材料】

1. 营养物 pH7.8 液体培养基或肉汤。
2. 试管、平皿、琼脂。

【方法】

1. 加 2.5g 琼脂至 100ml pH7.8 的液体培养基中。
2. 加热溶化,以双层纱布过滤,除去杂质,补足失水,分装三角烧瓶或试管内(培养基约占 1/5 试管容量)盖好棉塞。
3. 高压 103.4kPa 灭菌 15 分钟后,趁热将试管斜置(斜面长度约为试管长度的 2/3),冷凝后即为琼脂斜面培养基。或待琼脂培养基冷至 50~60℃ 时,以无菌操作倾入灭菌的无菌平皿中(直径 9cm 的平皿倾注培养基约 13~15ml),迅速摇匀,平皿使之成平板,冷凝后即成琼脂平板。

注:若在肉汤培养基加入 0.1%~0.5% 琼脂,则制成琼脂半固体培养基。

实验 2 细菌的分离与接种法

一、接种环(针)的用途

接种环(针)又称白金耳(针),是细菌学实验所不可缺少的最常用工具。它的使用是一

项重要的基本技术,必须熟练掌握。

1. 结构 接种环(针)由三部分组成,环(针)部分以用白金丝制成为佳,因易于传热、散热,不生锈而经久耐用。但因价昂,通常多用镍合金丝代替。常用的接种环直径约为2~4mm,长40~50mm,其一端固定于金属杆(多为铝制)上,金属杆的另一端为绝热柄(图1-1-2)。

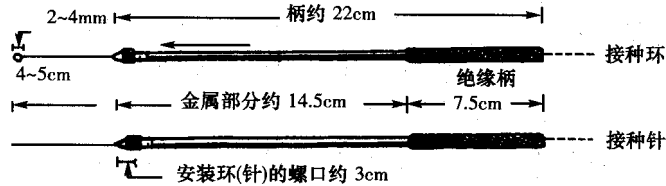


图 1-1-2 接种环(针)的结构

2. 用法 使用时手持绝热柄,先在氧化焰中烧红镍丝部分,再平持接种环(针)使金属杆在火焰中通过3次灭菌,冷却后即可取菌或待试标本。用后立即将染菌的镍丝部分先于还原焰中烧灼,再移于氧化焰中烧红,随后按上法将金属杆部分在火焰中通过3次,搁置于架上,切勿随手弃置,以免灼焦台面或其他物件。或使用电热式接种环灭菌器也可(图1-1-3)。

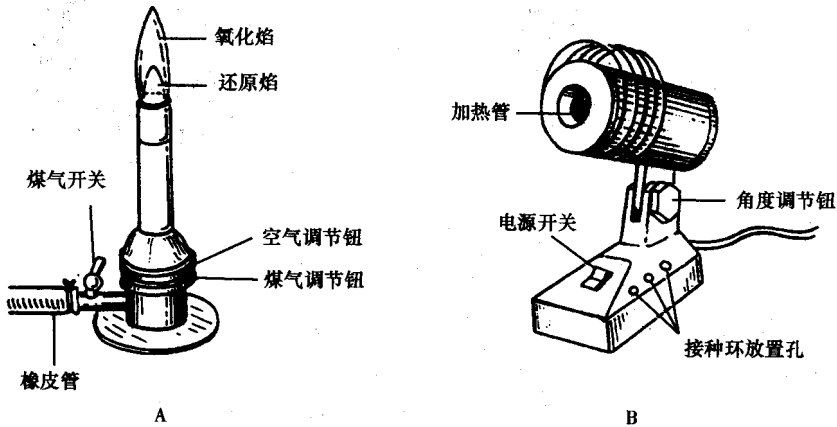


图 1-1-3 接种环(针)火焰灭菌用具

A. 煤气灯;B. 电热式接种环灭菌器

3. 用途 接种环用于划线分离和纯菌移种以及涂片制备等;接种针主要用于挑选菌落和穿刺接种等。

4. 实践 通过细菌的分离及各种培养基接种过程,初步学会正确用法,并在以后的各次实验中不断巩固熟练并正确掌握。

二、平板划线分离培养法

细菌在自然界中分布广、种类多,而被检材料又常含有一种以上的细菌,为了对特定细菌进行研究或鉴定,必须从混杂的材料中分离出所需的细菌,以获得纯种。分离的方法有多种,常用平板分区划线法。

【材料】

1. 菌种 葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液。
2. 培养基 琼脂平板。

【方法】

1. 烧灼灭菌接种环,待冷,以接种环取一环混合菌液。
2. 左手立即持起平板,五指固定平皿盖边缘,向外反转手掌使平皿盖向上,则平板落于手掌内,用拇指和中指固定平皿边缘,再向内反转手掌,使平皿盖向下放于桌面上,但此时手指仍持住平皿边缘,并稍微提起,作好备用状态。
3. 左手斜持(45°角)平板,右手持已取材的接种环,两肘固定于实验台边缘使双手等高,平板在煤气灯或酒精灯火焰前上方5~6cm距离,以右手持接种环在平板上侧的原始部位以30°~40°角度反复涂4~5次,然后烧灼接种环,待冷后,稍微通过原始部位向图示“1”区引出直线,如图示“1”区往返划线;旋转平板,重新烧灼接种环,待冷后,通过“1”区向“2”区引出一直线往返划线,如此重复4次。要求:划线每区之间只有一条线连接;划线既密又不重叠;四个区占据整个平板为宜(图1-1-4)。

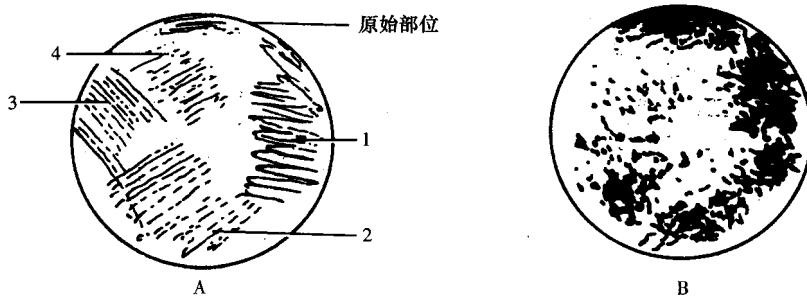


图1-1-4 平板划线法

A. 平板划线法; B. 孵育后菌落的散布情况

4. 划线完毕,将平板放进平板盖内,并在平板底玻璃上用蜡笔标明标本(菌种)名称,班室座号,日期,将平板倒置(底在上)放于37℃孵箱培养。
5. 经18~24小时后取出,观察平板表面生长的各种菌落,注意其大小、形状、边缘、透明度、颜色等特征。

三、斜面培养基接种法

琼脂斜面培养基一般供细菌繁殖,用作纯培养;某些特殊斜面培养基可作观察生化反应等特殊用途。

【材料】

1. 菌种 大肠杆菌、葡萄球菌斜面培养物。
2. 培养基 琼脂斜面培养基。

【方法】

1. 取一菌种管与培养管置于左手食指、中指、无名指之间,拇指压住试管底部上方,使菌种管靠近火焰一侧,接种管位于外侧,斜面均向上。

2. 右手拇指和食指分别松动两管棉塞,火焰灭菌接种环。
3. 以右手小指与手掌,小指与无名指分别拔取两管棉塞(先外后内),将两管口迅速通过火焰灭菌。
4. 将灭菌的接种环插入菌种管,从斜面上取菌苔少许。退出菌种管,迅速伸入待接种的培养管,在斜面上先由底部向上拉一条线,再从斜面底部向上轻轻曲折连续划线(图1-1-5)。

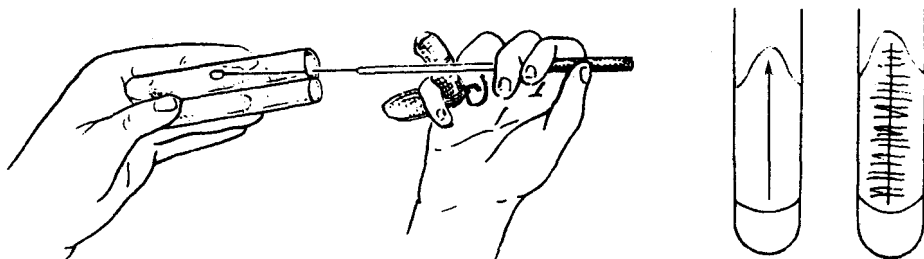


图 1-1-5 双管移种法和斜面接种法

5. 取出接种环,在火焰上灭菌管口,顺序塞上棉塞(先塞菌种管,后塞接种管),然后灭菌接种环;做好标记。 37°C 孵育 18~24 小时后观察结果。细菌在培养管中的接种线上,生长出许多菌落连成一片,形成了菌苔。不同种的细菌菌苔,其透明度、颜色等特征不同。

四、液体培养基接种法

肉汤、蛋白胨水、各种单糖发酵管等液体培养基都用本法接种细菌。接种肉汤经孵育后,可观察细菌不同生长情况。有的均匀混浊,有的沉淀生长,亦有表面形成菌膜。其他的液体培养基接种后,大多供作测定生化特性使用。普通液体培养基一般作增菌用。

【材料】

1. 菌种 大肠杆菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌斜面培养物。
2. 培养基 蛋白胨水及五糖发酵管培养基。

【方法】

如斜面培养基接种法握持菌种管,挑取少量菌苔,伸入待接种的培养基管内,在接近液面的管壁上轻轻研磨,并沾取少许培养液调和,使菌混合于其中(图 1-1-6)。

五、穿刺接种法

凡培养基制好后,其外形呈一圆柱直立于试管内者,均用穿刺法接种之。属于此类接种法的有半固体琼脂培养基、醋酸铅培养基、明胶培养基等。

【材料】

1. 菌种 变形杆菌、葡萄球菌斜面培养物。
2. 培养基 半固体琼脂培养基和醋酸铅培养基。

【方法】

1. 如斜面培养基接种法,握持菌种管及待接种管培养基。
2. 右手持接种针,灭菌冷却后,以针挑取菌苔接种半固体培养基时,垂直刺入培养基的中心。接种醋酸铅培养基时,则沿管壁的一侧穿刺至近底部 0.5cm 处,然后循原路退出

(图 1-1-7)。半固体琼脂培养基穿刺接种,主要是观察细菌有无动力。接种后经孵育,有动力的细菌,该菌沿着接种向外扩散,呈毛刷状生长;无动力的细菌,该菌沿接种线生长,无扩散现象出现。醋酸铅培养基观察有无黑色沉淀物形成。

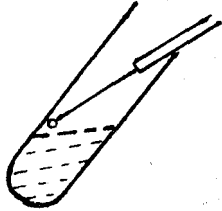


图 1-1-6 液体培养基接种法

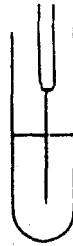


图 1-1-7 穿刺接种

实验 3 倾注培养和活菌计数

在自然界中广泛存在极其庞大的各种微生物,如土壤、水、空气以及正常的机体。在生产实践和卫生防疫工作中常常对土壤、水以及空气中的细菌总数进行检测。下面以水中细菌总数的检测为例,介绍细菌菌落计算器的使用。

【材料】

1. 培养基 高层琼脂培养基。
2. 河水(或井水、池水)、自来水。
3. 无菌生理盐水、无菌试管、无菌吸管、无菌空培养皿、细菌菌落计算器。

【方法】

1. 取无菌空平皿 4 只,分别为 1、2、3、4 号。
2. 吸取 1ml 自来水置于 1 号平皿中。

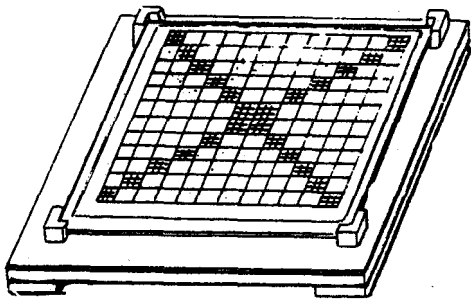


图 1-1-8 细菌菌落计算器

3. 分别吸取相同河水(或井水)原倍、 10^{-1} 、 10^{-2} 各 1ml 加入 2、3、4 号平皿中。

4. 取 4 支溶化且冷至 45°C 的高层琼脂,分别倾注于上述 4 个培养皿中,充分混匀待凝。

5. 37°C 孵育 24 小时取出观察,并分别在细菌菌落计算器上算出自来水和河水(或井水)中每毫升含有的活细菌数。菌落计算时,一般选择菌落数在 30~300 间的培养皿,分别乘以稀释倍数,再取其平均值即得。

6. 细菌菌落计算器:细菌菌落计算器(图 1-1-8)是一块玻璃板上刻划有 144 个面积为 1cm^2 的小正方形格。将长有菌落的培养皿放上,计算 10 个小方格内的菌落数,如为 30 个,则平均 1 小方格内为 3 个菌落。培养皿的面积是 $2\pi r$,若其直径是 9cm,则半径为 4.5cm,整个培养皿上的菌落数是 $3.1416 \times 4.5^2 \times 3$ 个 = 191 个菌落。

(黄 敏)

第二实验 细菌形态学检查法

实验 4 显微镜的使用

细菌个体微小,肉眼不能看到,必须借助普通显微镜之油镜,将其放大 1000 倍左右,才能看清。因此,必须熟练掌握显微镜的使用和保护,尤其是油镜的使用和保护。

基本原理是光线从标本玻片经空气进入镜头时,由于介质密度不同而发生折射现象,因此进入物镜中的光线很少,结果视野很暗,物像不清晰。如在玻片上加上折光率和玻片($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),就可避免光线的分散,加强视野的亮度,获得清晰的物像。

【材料】

显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸。

【方法】

1. 油镜的识别 油镜头上都有标记;标有 $90\times$ 或 $100\times$;镜头前端有黑、白或红色的圆圈;刻有“Ⅲ”或 Oil 等,其入光孔径也较其他物镜小。

2. 油镜的使用(观察细菌的形态)

(1) 显微镜平稳地安放在实验台适宜处。

(2) 以天然光线为光源时,使用平面反光镜。以灯光为光源时,使用凹面反光镜。

(3) 把集光器升到最高位置,把光圈完全打开,增大射入光线的强度。

(4) 将标本固定在载物台上,先把低倍镜调至视野最亮,并找到标本视野的适当位置,然后换用油镜。

(5) 先在玻片上滴香柏油一滴,用眼从侧方看着物镜,缓慢转动粗调节器,使物镜头浸于油镜内,并几乎与玻片接触为止,但勿使两者相碰,防止损伤镜头或玻片。然后从目镜观察,仔细转动粗调节器,看到模糊物像时,再调动细调节器,使物像清晰,未能看到物像时,可重复上述操作。

(6) 油镜头使用后应立即用擦镜纸擦净镜头上的油。如油已干,可在拭镜纸上滴少许二甲苯擦拭,并随即用干的擦镜纸擦去二甲苯,以防止腐蚀镜片。注意在擦镜纸擦拭时,要求顺一个方向旋转擦,不能两个方向来回擦。

3. 显微镜的保护

(1) 显微镜使用时要精心保护,不得随意拆散和碰撞。

(2) 取送显微镜时,应右手持镜臂,左手托镜座,平端于胸前。

(3) 不用时,将接物镜转开呈“八”字,使其不正对集光器,集光器下降,罩上镜套。登记使用前后的情况,签名。对号归位。

实验 5 细菌不染色标本检查法(悬滴法)

不染色标本中的细菌,内部均匀,折光性与周围环境相似,不能清楚见到形态特征与结构。一般主要用于观察细菌的动力及运动状况。